



COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

Case Docket No. TOYAM85.0014US
Date: March 11, 2002

PATENT

MAY 01 2002

RECEIVED

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s) : Kazutaka Ikeda, et al.
Appl. No. : 10/073,647
Filed : February 11, 2002
For : METHOD FOR EVALUATING
DRUG SENSITIVITY
Examiner : Unknown
Group Art Unit : Unknown

I hereby certify that this correspondence and all enclosed
attachments are being deposited with the United States
Postal Service as first class mail in an envelope addressed
to: United States Patent and Trademark Office, P.O. Box
2327, Arlington, VA 22202, on

March 11, 2002

(Date)

Katsuhiro Arai, Reg. No. 43,315

TRANSMITTAL LETTER

United States Patent and Trademark Office
P.O. Box 2327
Arlington, VA 22202

ATTENTION: APPLICATION BRANCH

Dear Sir:

Enclosed for filing in the above-identified application are:

- (X) A Certified Copy of a Japanese Patent Application No. 2001-178169, filed June 3, 2001.
- (X) The Commissioner is hereby authorized to charge any fees which may be required to Account No. 11-1410.
- (X) Return prepaid postcard.

Katsuhiro Arai
Registration No. 43,315
Agent of Record



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

TECH CENTER 160/2900

091272

MAY 01 2002

RECEIVED

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 6月13日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-178169

[ST.10/C]:

[JP2001-178169]

出 願 人

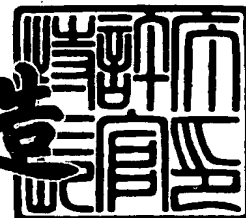
Applicant(s):

理化学研究所

2002年 2月22日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3009727

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-8682

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成13年 6月13日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/00

【発明の名称】 薬物感受性の評価方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

【氏名】 池田 和隆

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

【氏名】 二木 宏明

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

【氏名】 矢野 良治

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県新潟市浦山 2 - 1 - 6 6 - 2 1 6

【氏名】 熊西 敏郎

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県新潟市関屋田町 1 - 1 1 3

【氏名】 小林 徹

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 薬物感受性の評価方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 mRNA非翻訳領域の多様性が薬物に対する感受性に影響する遺伝子について、非翻訳領域の差異を検出し、検出された差異に基づいて薬物に対する感受性を評価することを含む、ヒトまたは動物の薬物に対する感受性の評価方法。

【請求項 2】 非翻訳領域の差異が非翻訳領域の長さの差異である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 遺伝子がミューオピオイド受容体遺伝子であり、薬物がミューオピオイド受容体を標的とするものである請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】 薬物がモルヒネである請求項 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトまたは動物の薬物に対する感受性の評価方法に関する。

【0002】

【従来技術】

鎮痛剤や抗癌剤などの薬物に対する感受性（薬物感受性）には個人差があることが知られている。特に副作用の強い薬物については、過剰量の投与が重大な結果を招くため、個人差を事前に予測することが求められている。このため、薬物感受性に個人差が生じる原因について研究が進められており、遺伝子の翻訳領域における多様性が薬物感受性に影響することが報告されている。

【0003】

しかしながら、薬物感受性に関与する遺伝子の中には、遺伝子のコード領域における多様性が認められないものもあり、このような遺伝子に関与する薬物感受性は、薬物を実際に投与せずに評価することが難しい。例えば、モルヒネの場合には、従来の研究により、モルヒネの脳内標的がミューオピオイド受容体であることは明らかにされていたが、この受容体のタンパク質構造の個人差はほとんど

ないため、タンパク質構造からモルヒネ鎮痛効果の個人差を予測することはできない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な指標に基づく、薬物感受性を薬物を投与せずに評価する方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、モルヒネ鎮痛効果が減弱したマウス系統であるCXBKマウスを用いて検討を行った結果、mRNAの非翻訳領域における多様性が薬物感受性に大きく影響し得ることを見出した。この知見に基づき、本発明は完成された。

【0006】

本発明は、mRNA非翻訳領域の多様性が薬物に対する感受性に影響する遺伝子について、非翻訳領域の差異を検出し、検出された差異に基づいて薬物に対する感受性を評価することを含む、ヒトまたは動物の薬物に対する感受性の評価方法を提供する。

【0007】

非翻訳領域の差異は非翻訳領域の長さの差異であってもよい。

【0008】

遺伝子としては、ミューオピオイド受容体遺伝子が挙げられ、この場合、薬物はミューオピオイド受容体を標的とするものである。遺伝子がミューオピオイド受容体遺伝子である場合には、薬物としてはモルヒネが挙げられる。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の評価方法は、ヒトまたは動物の薬物感受性の評価方法であり、mRNA非翻訳領域の多様性が薬物感受性に影響する遺伝子について、非翻訳領域の差異を検出し、検出された差異に基づいて薬物感受性を評価することを特徴とする。

【0010】

本発明において、薬物は、ヒトまたは動物に作用するものであれば特に限定さ

れず、鎮痛剤、抗癌剤、抗アレルギー剤、降圧剤、利尿剤、麻酔剤などが挙げられる。特に、薬物は、ヒトまたは動物の個体間において感受性の差が大きいものが好ましい。感受性の個人差の大きい薬物であるほど、感受性の高い個体に薬物が過剰に投与された場合の影響が大きいからである。

【0011】

動物は特に限定されないが、通常には、脊椎動物であり、好ましくは哺乳動物である。

【0012】

遺伝子は、mRNA非翻訳領域の多様性が薬物感受性に影響する遺伝子であればよい。mRNA非翻訳領域の多様性が薬物感受性に影響する遺伝子は、その産物が個体の薬物感受性に影響するもの（以下、「薬物感受性に関与する遺伝子」ともいう）であって、薬物感受性が異なる個体間で非翻訳領域に塩基配列の差異を有するものを意味する。薬物感受性に関与する遺伝子の例としては、薬物の受容体の遺伝子、薬物の代謝に関与する酵素の遺伝子などが挙げられる。

【0013】

mRNAの非翻訳領域の多様性が薬物感受性に影響する遺伝子は、以下のような方法によって見出すことができる。

【0014】

（１）薬物感受性が異なるヒトまたは動物について、ゲノムDNAを鋳型としたPCR法などでその薬物感受性に関与する遺伝子の非翻訳領域を増幅する。その領域のサイズや塩基配列を電気泳動法やシーケンス法によって解析することで差異を同定する。差異の同定されたものが本発明の評価方法に使用できる遺伝子である。

【0015】

（２）薬物感受性が異なるヒトまたは動物よりmRNAを調製し、同時に多数の遺伝子発現パターンが解析できるマイクロアレイ法によって、そのmRNAをプローブとした遺伝子発現のプロファイリングを行う。発現に差異が認められる遺伝子について、その非翻訳領域のサイズや塩基配列を解析し、その領域の差異を同定するとともに、薬物感受性に関与することを確認する。差異が同定されかつ薬物感

受性に関与するものが本発明の評価方法に使用できる遺伝子である。

【0016】

なお、本発明の評価方法に使用できる遺伝子は、mRNA非翻訳領域の多様性が薬物感受性に影響する遺伝子である限り、上記の方法により見いだされるものに限定されるものではない。

【0017】

非翻訳領域の差異は、塩基配列の差異を検出してもよいし、塩基配列の差異がサイズ（長さ）に反映されている場合には長さの差異として検出してもよい。

【0018】

mRNAの非翻訳領域における差異の検出方法は、特に限定されない。例えば、長さの差異の場合には、非翻訳領域の長さはmRNAの全長に反映されるので、mRNAの全長を測定してもよい。例えば、試料からmRNAを調製し、アガロースゲル電気泳動に付し、mRNAに相補的な塩基配列を有する標識したプローブを用いてノザンブロット分析を行うことによりmRNAの長さの差異を検出できる。長さの異なるmRNAについてそれぞれの塩基配列が明らかになっている場合や塩基配列の差異が明らかになっている場合には、それらの塩基配列に基づいて、mRNAの長さや塩基配列の差異が増幅産物の性質（長さ等）や有無に反映されるように設定したプライマーを用い、試料から調製されたcDNAを鋳型としてPCR法により増幅を行い、その増幅産物の性質や有無を調べることによりmRNAの長さや塩基配列の差異を検出できる。また、長さの異なるmRNAを生じる遺伝子や塩基配列の異なるmRNAを生じる遺伝子のゲノムDNAにおける塩基配列が明らかになっている場合には、それらの塩基配列に基づいて、mRNAの長さや塩基配列の差異が増幅産物の性質（長さ等）や有無に反映されるように設定したプライマーを用い、試料から調製されたcDNAまたはゲノムDNAを鋳型としてPCR法により増幅を行い、その増幅産物の性質や有無を調べることによりmRNAの長さや塩基配列の差異を検出できる。

【0019】

非翻訳領域の多様性が薬物感受性に影響する遺伝子としては、ミューオピオイド受容体遺伝子が挙げられる。ミューオピオイド受容体遺伝子の非翻訳領域には、非翻訳領域の長さの差異に反映される差異がある。

【 0 0 2 0 】

薬物感受性に関与する遺伝子としてミューオピオイド受容体遺伝子を用いた場合には、薬物はミューオピオイド受容体を標的とするものであればよく、このような薬物の例としては、モルヒネが挙げられる。

【 0 0 2 1 】

本発明の方法により、薬物感受性が評価できる理由は以下の様に考えられる。後記実施例に示される様に、モルヒネの鎮痛効果が減弱していることが知られているCXBKマウスにおいて、ミューオピオイド受容体遺伝子のmRNAの非翻訳領域が異常に長いこと、ミューオピオイド受容体遺伝子のmRNAの脳内量が減少していること、及び、コードされるミューオピオイド受容体自体には異常がないことが判明した。さらに、ミューオピオイド受容体遺伝子のmRNAの非翻訳領域の異常と、モルヒネ鎮痛効果の減弱とが関連していることが確認された。以上から、ミューオピオイド受容体遺伝子のmRNAの非翻訳領域の塩基配列に基づいて、モルヒネに対する感受性を評価できることが判明した。これは、mRNAの非翻訳領域の異常のためにmRNAが不安定でその脳内量が減少し、その結果、ミューオピオイド受容体の脳内量が減少してモルヒネの鎮痛効果が減弱するためと推定される。また、ミューオピオイド受容体を標的とする薬物（オピオイド）に対する感受性もモルヒネに対する感受性と同様に評価できると考えられる。

【 0 0 2 2 】

非翻訳領域の塩基配列は進化的にあまり保存されていないので、マウスに限らず、他の動物やヒトでもミューオピオイド受容体遺伝子のmRNAの非翻訳領域が個体間で多様であると考えられる。従って、非翻訳領域がmRNAの安定性に大きく影響して、mRNA量に個体差が生じること、及び、mRNAの大小がミューオピオイド受容体タンパク質量の大小に対応し、タンパク質量にも個体差が生じ、最終的にオピオイドの効果に個体差が生じることが、マウス以外の動物やヒトにおいても同様であると考えられる。さらに、ミューオピオイド受容体遺伝子に限らず、他の薬剤感受性に関与する遺伝子においてもmRNAの非翻訳領域が個体間で多様であると考えられる。

【 0 0 2 3 】

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明する。

【0024】

【実施例1】

(1) CXBKマウスにおける異常なミューオピオイド受容体(μ -OR) mRNA

CXBKマウスにおけるオピオイド受容体(OR) mRNAの発現を調べるために、ノザンブロット分析を行った。

【0025】

マウスは、 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 5\%$ 、及び、12時間明暗周期(午前7時～午後7時が明)に維持した環境下で、同性の同腹仔とともにアルミニウムケージ(ケージ当たり5匹以下)で飼育した。マウスは、標準市販実験飼料(NMF; Oriental Yeast Co. Ltd.)及び水を随意に摂取可能とした。CXBKマウスは、初めはThe Jackson Laboratoryから購入した。C57BL/6CrSlc(B6)及びBALB/cCrSlc(BALB/c)マウスは、日本SLCから購入した。実験操作及び飼育条件は、インスティテューショナル・アニマル・ケア・アンド・ユーズ・コミッティー(Institutional Animal Care and Use Comittee)により承認された。全ての動物は、当研究所の動物実験ガイドラインに沿って、人道的に世話し取り扱った。

【0026】

mRNAは、各ナイーブ成獣雄マウスの脳からメッセンジャーRNAアイソレーションキット(Stratagene)を用いて別々に調製した。RNAサイズマーカーは、Novagenから購入した。RNAをホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜(PROTRAN; Schleicher & Schuell)またはナイロン膜(Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech)に転写させた。 μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体mRNA用のプローブは、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いるPCRにより、pSPOR μ 、pSPOR δ 及びpSPOR κ をそれぞれ鋳型として用いて調製した。受容体の膜貫通V-VII領域に相当するフラグメントに対する共通プライマー対は、5'-CT(C/G)ATCATC(A/T)(C/T)(G/T)GT(C/G)TG(C/T)TA-3' (センスプライマー: 配列番号1) 及び5'-GCGGATCCTTGAAGTT(C/T)TC(C/G)TCCAG-3' (アンチセンスプライマー: 配列番号2)であった。ハイブリダイゼーションは、 $[^{32}\text{P}]$ 標識プ

ローブ (2×10^6 cpm/ml) を用いて、ハイブリダイゼーション溶液 (ExpressHyb Hybridization Solution; Clontech) 中 60°C で約20時間行った。プロットは、0.1% SDSを含む $0.1 \times \text{SSC}$ (150 mM NaCl 及び 25 mM クエン酸ナトリウム) により 42°C で洗浄した。オートラジオグラフィーを行い、BAS-5000 イメージングアナライザー (Fujifilm) を用いて分析した。任意の測定領域における放射能に比例する光刺激ルミネセンス (PSL) (Anemiy et al. (1987) Science, 237:164-168) の値を定量分析で比較した。膜を、0.1% SDSを含む $0.1 \times \text{SSC}$ 中 100°C で10分処理し、デハイブリダイズした。 μ 、 δ 及び κ -OR mRNA の発現を同じ膜を用いて分析した。

【0027】

この結果、CXBKマウスは、サイズの大きい (14.5 kb) μ -OR mRNA を脳に有していた一方、マウスの先祖系統であるB6マウスは 12 kb の μ -OR mRNA を有していた。B6とCXBKマウスのヘテロ接合体は、 14.5 kb mRNA の信号はかすかではあったが、両方のmRNAを有していた。マウスの他方の先祖系統であるBALB/cマウスは、 12 kb μ -OR mRNA のみを有していた。CXBKマウスにおける μ -OR mRNA のシグナル強度は、等量の脳mRNAを電気泳動し分析したところ、B6及びBALB/cマウスにおける強度の約60%であった。 δ -OR mRNA のサイズは、全ての系統で同じであったが、CXBKマウスにおける δ -OR mRNA のシグナル強度は、B6及びBALB/cマウスにおける強度よりも高かった。 κ -OR mRNA のサイズ及びシグナル強度は、全ての系統において、有意には異なっていなかった。 μ -OR mRNA におけるサイズの相違は、CXBKマウスの μ -OR 遺伝子が、先祖系統のマウスのものと異なることを示唆する。

【0028】

(2) CXBKマウスにおける μ -OR mRNA の分布

in situ ハイブリダイゼーション組織化学分析を用いて、CXBKマウスの脳における μ -OR mRNA の発現と、B6マウスの脳における発現を比較した。

【0029】

μ -OR mRNA 用のプローブは、開始メチオニンコドンを含む μ -OR cDNA 配列 (Ike da et al. (1996) Ann. NY Acad. Sci. 801:95-109) の一部に相補的な45-mer オリゴヌクレオチドであった。オリゴヌクレオチドを、ターミナルデオキシリボヌクレオチチジルトランスフェラーゼ (宝酒造) を用いて [^{33}P] dATP で標識し、セ

ファデックスG-25スピンカラム (Boehringer Mannheim) を用いて精製した。プローブの比活性は 5×10^8 dpm/ μ gであった。In situハイブリダイゼーションは以前に報告 (Ikeda et al. (1998) J. Comp. Neurol. 399:139-151) されたように行った。成獣雄B6及びCXBKマウスの脳の水平及び矢状切片をスライド上の置き、4%パラホルムアルデヒド/0.1 MナトリウムPBSで固定した。切片を、 5×10^3 dpm/ μ lのプローブを含むハイブリダイゼーション溶液中で42℃において16時間ハイブリダイズさせた。スライドを、0.1×SSC-0.1%サルコシル(Sarkosyl)で、55℃において40分間ずつ3回洗浄し、脱水し、BAS-5000イメージングアナライザー (Fijifilm) を用いて分析した。PSLの値を定量分析により比較した。次いで、スライドをハイパーフィルム-β-マックス (Amersham Pharmacia Biotech) に2週間露出させ、X線フィルム像を得た。

【0030】

この結果、CXBKマウスの脳において、 μ -OR mRNAは、B6マウスの脳と同様の様式で、種々の脳の領域で発現していた。しかし、CXBKマウスの脳におけるmRNAのシグナル強度は、有意に低かった (B6マウスの脳におけるシグナル強度の約70%)。このことは、ノザンブロット分析の結果と一致した。同様の結果が、B6及びCXBKマウスの脳の矢状切片でも得られた。これらの結果は、 μ -OR mRNAの発現レベルがCXBKマウスの脳全般において低いことを示唆する。

【0031】

(3) B6及びCXBKマウスの μ -OR遺伝子間の塩基配列の相違

完全なコード領域を含む、 μ -OR mRNAの一部 (2184塩基、GenBankアクセッション番号AB047546) をB6とCXBKマウスで比較した。配列決定は以下のように行った。

【0032】

CXBKマウス及びB6マウスの脳cDNAを、1stストランドcDNAシンセシスキット (Clontech) を用いて、対応するmRNAをテンプレートとして合成した。ゲノムDNAは、マウスの尾または肝臓から調製した。DNAフラグメントは、Pfu DNAポリメラーゼを用いてPCRにより増幅した。 μ -ORcDNA用のPCRプライマーは、5'-GCGCCTCCGTGTACTTCTAA-3' (センスプライマー：配列番号3) 及び5'-GATGGCAGCCTCTAAGTTTA

-3' (アンチセンスプライマー: 配列番号4) であった。PCR産物の塩基配列は、PCRプライマーと以下のような他のプライマーを用いて分析した。5'-AACCATGGACAGCAGCGCCG-3' (配列番号5)、5'-GCCACTAGCAGCTGCCCTT-3' (配列番号6)、5'-CAGTGGATCGAACTAACCACCAGCT-3' (配列番号7) 及び5'-GGATTTTGCTCAGAATGGTGGCATG-3' (配列番号8) (Kaufman et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:15877-15883)。 μ -OR遺伝子 (翻訳開始部位の5'-隣接領域) 用のPCRプライマーは、5'-ATGCATTCTTGCTCCTCAAGGATC-3' (センスプライマー: 配列番号9) 及び5'-TCCCTGGCCGGCGCTGCTGTCCAT-3' (アンチセンスプライマー: 配列番号10) であった。PCR産物の塩基配列は、PCRプライマーと以下のような他のプライマーを用いて分析した。5'-AGTGGGGGCACATGAAACAGGCTTC-3' (配列番号11)、5'-GAGGGTTATTAA TGTGTCCTTTAC-3' (配列番号12) 及び5'-GTTGTTACAAAGAACTTAGAGTCT-3' (配列番号13) (Liang et al. (1995) Brain Res. 679:82-88)。塩基配列決定は、PRISM 310ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) を用いて行った。

【0033】

この結果、CXBKマウスにおける μ -OR mRNAのコード領域 (1197塩基) の配列は、B6マウスのものと同じであった。このことは、 μ -ORタンパク質の構造は正常であり、 μ -OR mRNAの非翻訳領域 (UTR) がCXBKマウスにおいて異常に長いことを示す。配列の相違は、調べた3'-UTR領域 (726塩基) ではなく、調べた5'-UTR領域 (214塩基) には単一塩基の配列の相違のみがあった。このことは、B6マウスとCXBKマウスとの間の μ -OR mRNAのサイズの相違は、 μ -OR mRNAの調べていないUTRに存在することを示している。また、B6及びCXBK μ -OR遺伝子における、翻訳開始部位の5'-隣接領域 (1107塩基対、GenBankアクセッション番号AB047547) も比較した。これらの間の配列の相違は、5'-UTRの相違に対応するものを除いて検出されなかった。単一塩基の配列の相違がCXBK表現型全体を引き起こすとは、BALB/cマウスがこの領域にCXBKマウスと同じ塩基配列を有するため、考えられない。

【0034】

(4) CXBK μ -OR遺伝子の2コピーを受け継いでいるマウス (CX μ)

CXBK μ -OR遺伝子とCXBK表現型との関連を調べるため、B6マウスとCXBKマウスのヘテロ接合体を交配させることにより同腹仔を作成した。これらの同腹仔は以下の通りであった。B6 μ -OR遺伝子の2コピーを受け継いでいるマウス (B6 μ)、CXBK μ -ORを受け継いでいるマウス (CX μ)、及び、CXBK μ -OR遺伝子の1コピーを受け継いでいるマウス (He μ)。これらの同腹仔を用いて、CXBKマウスの脳におけるOR mRNAのサイズ及びレベルの相違が、CXBK μ -OR遺伝子に起因するものか否か明らかにするために、(1)と同様にノザンブロット分析を行った。この結果、B6 μ マウス及びCX μ マウスにおける μ -OR mRNAのサイズは、それぞれ、B6マウス及びCXBKマウスにおけるものと同じと推定された。CX μ マウスにおける μ 及び δ -OR mRNAのシグナル強度は、B6 μ マウスにおけるシグナル強度と比較した場合、それぞれ、低及び高であった。He μ マウスは、B6マウスとCXBKマウスのヘテロ接合体と同様にこれらの μ -OR mRNAの両方を有していた。これらの結果は、CXBK μ -OR遺伝子が、CXBKマウスにおけるOR mRNAのサイズ及び発現レベルの相違を引き起こしていることを示唆する。

【0035】

(5) CX μ マウスの、オピオイドに対する減弱した感受性

第2に、これらの同腹仔を用いて、テールフリック、ホットプレート及びオープンフィールドのテストにより、CXBK μ -OR遺伝子がCXBKマウスにおけるモルヒネ効果の減弱に関係するか否かを調べた。これらのテストは、以下の様に実施した。

【0036】

ナイーブ成獣マウス (6~15週齢) を、全ての実験で使用した。各マウスは、昼間 (午前8:00以降午後5:00以前) に試験した。マウスの体重を測定し、テールフリック (tail-flick)、オープンフィールド (open-field) 及びホットプレート (hot-plate) のテストを (この順序で) 行い、基本的反応性及び活動性を調べた。モルヒネ塩酸 (10 mg/ml) は、武田純薬工業から購入した。(1S-trans)-3,4-ジクロロ-N-メチル-N-(2-[1-プロリジニル]シクロヘキシル)ベンゼンアセトアミド塩酸 [(-)-U-50488] (Research Biochemicals) を蒸留水に溶解し、使用時までストック溶液を-20℃に保存した。各薬剤溶液を、各実験日に滅菌生理食塩水 (0.9%

NaCl)で1 mg/mlに希釈した。薬剤溶液を、10 ml/kgの用量でマウスに腹腔内注射した。テールフリック、オープンフィールド及びホットプレートのテストは、注射の10、15及び20分後にそれぞれ行った。テールフリックテストは、若干の改変 (Ikeda et al. (1999) *Neurosci. Res.* 34:149-155) をしたD'Amour及びSmith (J. Pharmacol. Exp. Ther. 72:74-79 (1941))の方法に従って行った。カットオフ時間は15秒であった。ホットプレートテストは、若干の改変 (Ikeda et al. (1999) *Neurosci. Res.* 34:149-155) をしたWoolfe及びMacDonald (J. Pharmacol. Exp. Ther. 80:300-307(1944))の方法に従って行った。金属プレートの温度は $52.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ に調節した。テスト開始から一回目のジャンプまでの潜時を測定し、カットオフ時間は300秒であった。オープンフィールドテストは、以前に報告 (Ikeda et al. (1995) *Mol. Brain Res.* 33:61-71) されたように行った。マウスの水平及び垂直の移動を300秒間測定した。この実験では、種々の種類の移動がよく相関しており、歩行距離をマウスの移動として用いた。ANOVA及びScheffeのFポストホック検定を、群のデータを統計的に解析するのに用いた。 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

【0037】

モルヒネ (Mor) 鎮痛効果についてテールフリック及びホットプレートテストを行った結果を図1のA、Bに、モルヒネ誘発性活動昂進についてオープンフィールドテストを行った結果を図1のCに示す。また、CXBK μ -OR遺伝子が、CXBKマウスにおける、選択的 κ アゴニストの(-)-U-50488 (U-50) の鎮痛効果の減弱を引き起こすか否か調べた結果を図1のDに示す。図1中の値は平均値 \pm SEMである。A～Cにおいては各群10匹、Dにおいては各群6匹であった。

【0038】

B6 μ 、He μ 及びCX μ のマウスは、モルヒネが投与されないときには、同様な潜時で熱刺激に反応し、同様の自発的活動を示した。しかし、10 mg/kgのモルヒネの腹腔内投与後では、CX μ マウスは、鎮痛テストにおいて、同腹仔と比べて有意に短い潜時で熱刺激に反応した ($p < 0.05$ リピーテドメジャーANOVA)。このことは、CX μ マウスはモルヒネ鎮痛効果が低下していることを示す。オープンフィールドテストにおいては、B6 μ 及びHe μ マウスは、モルヒネ投与の前後とも同様な

距離歩行した。このことは、これらのマウスでは、馴化による移動活性の低下が、モルヒネ誘発性活動昂進により相殺されたことを示す。対照的に、CX μ マウスは、モルヒネ投与後は、モルヒネ投与前に比べて、有意に短い距離を歩行した（ $p<0.001$ ；ペアードtテスト）。このことは、モルヒネが、CX μ マウスの移動に対する、馴化の阻害効果を相殺することができなかったことを示す。これらの結果は、モルヒネの、CXBKマウスにおける鎮痛効果及び活動性昂進効果の減弱がCX μ -OR遺伝子と関連していることを示す。

【0039】

テールフリックテストにおいて、CX μ マウスは、10 mg/kgの(-)-U-50488の腹腔内投与後に、同腹仔と比べて有意に短い潜時で熱刺激に応答した（ $p<0.05$ リピーテドメジャーANOVA）。この結果は、CXBKマウスの(-)-U-50488鎮痛効果の減弱も、CXBK μ -OR遺伝子と関連することを示す。

【0040】

これらの、CXBK μ -OR遺伝子とCXBK表現型との間の三つの相関は、CXBK μ -OR遺伝子が、CXBK表現型に寄与することを示唆する。

【0041】

【発明の効果】

本発明により、薬物に対する感受性を、薬物を投与せずに評価することが可能になり、薬物に対する感受性の個体差を考慮した薬物投与が可能になる。本発明の評価方法によれば、非翻訳領域のサイズや塩基配列の差異を解析するだけで、適切な薬物処方を推奨することができる。

【0042】

【配列表】

<110> 理化学研究所(RIKEN)

<120> 薬物感受性の評価方法

<130> P-8682

<160> 13

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

ctsatcatcw ykgtstgyta

20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

gcggatcctt gaagttytcr tccag

25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

gcgcctccgt gtactttctaa

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gatggcagcc tctaagttta

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

aacctatggac agcagcgccg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

gccactagca cgctgccctt

20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

cagtggatcg aactaaccac cagct

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

ggattttgct cagaatgggtg gcatg

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

aatgcattct tgctcctcaa ggatc

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

tccctgggcc ggcgctgctg tccat

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

agtgggggca catgaaacag gcttc

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 12

gagggttatt aatgttgccc ttac

25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 13

gttggtacaa agaaacttag agtct

25

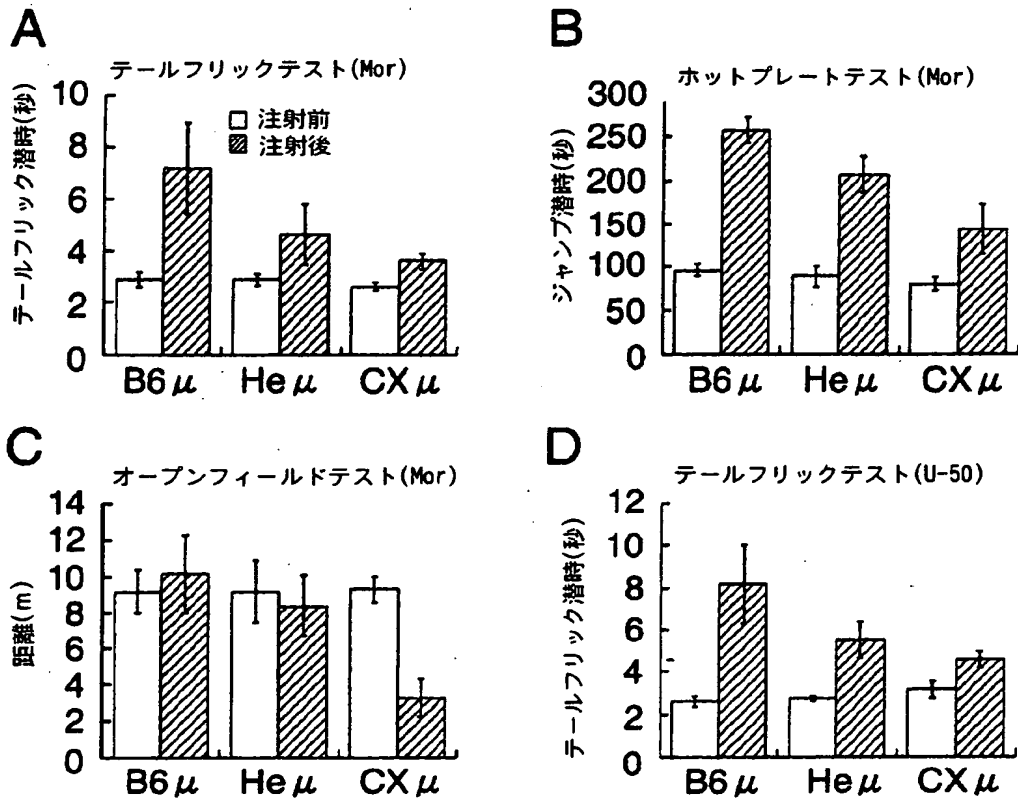
【図面の簡単な説明】

【図 1】 モルヒネ及び(-)-U-50499に対する感受性の評価結果を示す。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 薬物に対する感受性の評価方法を提供する。

【解決手段】 mRNA非翻訳領域の多様性が薬物に対する感受性に影響する遺伝子について、非翻訳領域の差異を検出し、検出された差異に基づいて薬物に対する感受性を評価することにより、ヒトまたは動物の薬物に対する感受性を評価する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所